

学校编码: 10384
学号: 31120091151101

分类号__密级__
UDC__



硕 士 学 位 论 文

对虾白斑综合症病毒（WSSV）三种主要结构 蛋白相互作用位点及病毒衣壳性质的研究

The Research into the Interaction Domains among Three
Major Structural Proteins and the Property of Capsid

陈炜钰

指导教师姓名：杨 丰 研 究 员

专 业 名 称：海洋生物技术

论文提交日期：2012 年 05 月

论文答辩时间：2012 年 06 月

学位授予日期：2012 年 06 月

答辩委员会主席：陈建明研究员

评 阅 人：_____

2012 年 06 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

目 录	I
缩 略 词	VI
中文摘要	VII
英文摘要	IX
前 言	1
1、对虾白斑综合症病毒(WSSV)及其分子生物学研究	1
1.1 对虾白斑综合症病毒的研究概况	1
1.1.1 对虾白斑综合症病毒的发现及其命名	1
1.1.2 对虾白斑综合症病毒的形态结构	3
1.2 对虾白斑综合症病毒的分离纯化	3
1.3 对虾白斑综合症病毒的基因组学研究	5
1.4 对虾白斑综合症病毒的蛋白质组学研究	7
1.4.1 对虾白斑综合症病毒的结构蛋白	9
1.4.2 对虾白斑综合症病毒结构蛋白质的研究意义	16
2、蛋白质相互作用主要的研究技术	18
3、本论文的研究目的、意义以及研究内容	20
第一部分：WSSV 三种主要结构蛋白之间的相互作用	23
1、前言	23
2、材料和方法	24
2.1 材料	24
2.2 方法	29
2.2.1 重组质粒的构建	29
2.2.2 突变体蛋白的表达和相互作用	30
3、结果	33

3.1 VP24 和 VP28 的相互作用	33
3.1.1 鉴定 VP24 与 VP28 相互作用的区域	33
3.1.2 鉴定 VP28 与 VP24 相互作用的区域	41
3.2 VP24 和 VP26 的相互作用	46
3.2.1 鉴定 VP24 与 VP26 相互作用的区域	46
3.2.2 鉴定 VP26 与 VP24 相互作用的区域	51
3.3 VP28 和 VP26 的相互作用	54
3.3.1 VP28 和 VP26 突变体载体的设计和构建	54
4、讨论	56
第二部分：WSSV 衣壳理化耐受性和组成形式的研究	62
1、前言	62
2、材料和方法	63
2.1 材料	63
2.2 方法	63
2.2.1 WSSV 完整病毒的制备	63
2.2.2 核衣壳及衣壳的纯化制备	64
2.2.3 不同温度处理衣壳	65
2.2.4 不同 pH 处理衣壳	65
2.2.5 不同尿素处理衣壳	66
2.2.6 不同 SDS 及 β 巯基乙醇处理衣壳	66
2.2.7 不同条件制备衣壳粒	66
3、结果	67
3.1 衣壳制备和自由巯基的封闭	67
3.2 衣壳温度耐受性研究	67
3.3 衣壳 pH 耐受性研究	68
3.4 不同尿素对衣壳的影响	71
3.5 不同 SDS 及 β 巯基乙醇对衣壳的影响	75
3.6 衣壳粒的制备研究	77
4、讨论	79

第三部分：WSSV VP28 的同源重组	81
1、前言	81
2、材料和方法	82
2.1 材料	82
2.2 方法	82
2.2.1 VP28 重组质粒的构建	82
2.2.2 重组质粒与 WSSV 病毒的活体导入	83
3、结果	84
3.1 PCR 扩增重组后基因组上可能存在的 EGFP 基因	84
3.2 重组后 WSSV 病毒粒子的荧光发射谱	85
4、讨论	85
参 考 文 献	87
致谢	98

Content

Abbreviation	VIII
Chinese abstract	IX
English abstract	XI
Introduction	1
1、 White spot syndrome virus(WSSV) and molecular biological research	1
1.1 Research of WSSV	1
1.1.1 Finding and naming of WSSV	1
1.1.2 Size and structure of WSSV	3
1.2 Purification of WSSV	3
1.3 Genomics of WSSV	5
1.4 Proteomics of WSSV	7
1.4.1 Structural proteins of WSSV	9
1.4.2 Significance of structural proteins research of WSSV	16
2、 Main research techniques in proteins interaction studying	18
3、 Contents and significance of this thesis	20
Part I: The interactions among the three major WSSV structural proteins	23
1、 Introduction	23
2、 Materials and methods	24
2.1 Materials	24
2.2 Methods	29
2.2.1 Construction of mutant gene vecotrs	29
2.2.2 Expression and inteaction of the mutant proteins	30
3、 Results	33

3.1 The interaction between VP24 and VP28	33
3.1.1 Identification of active domains of rVP24 in the interaction	33
3.1.2 Identification of active domains of rVP28 in the interaction	41
3.2 The interaction between VP24 and VP26	46
3.2.1 Identification of active domains of rVP24 in the interaction	46
3.2.2 Identification of active domains of rVP26 in the interaction	51
3.3 The interaction between VP26 and VP28	54
3.3.1 Design and construction of mutant gene vectors of VP26 and VP28	54
4、Discussion	56
Part II: Assembly mechanism and physicochemical tolerance of capsids of WSSV	62
1、Introduction	62
2、Materials and methods	63
2.1 Materials	63
2.2 Methods	63
2.2.1 Purification of WSSV intact virions	63
2.2.2 Purification and reparation of nucleocapsids and capsids	64
2.2.3 Treatment of capsids with different temperatures	65
2.2.4 Treatment of capsids with different pH	65
2.2.5 Treatment of capsids with different concentrations of urea	66
2.2.6 Treatment of capsids with SDS and Beta-mercaptoethanol in different concentrations	66
2.2.7 Preparation of capsomers with different conditions	66
3、Results	67
3.1 Preparation of capsids and their free radicals' blocking	67
3.2 Temperature tolerance of capsids	67
3.3 pH tolerance of capsids	68
3.4 Influence of different concentrations of urea on capsids	71
3.5 Influence of different concentrations of SDS and Beta-mercaptoethanol on	

capsids	75
3.6 Preparation of capsomers	77
4、 Discussion	79
Part III: Attempts to construct WSSV virions by homologous recombination of VP28	81
1、 Introduction	81
2、 Materials and methods	82
2.1 Materials	82
2.2 Methods	82
2.2.1 Construction of targeting vectors with recombinant gene of VP28	82
2.2.2 Injection with WSSV virions and targeting vectors	83
3、 Results	84
3.1 Examination recombinant genome by PCR amplification of egfp gene	84
3.2 Fluorescence spectra of recombinant virions.....	85
4、 Discussion	85
Reference	87
Acknowledgement	98

缩 略 词

aa: amino acids, 氨基酸

NEM: N-ethylmaleimide, N-乙基顺丁烯二酰亚胺

Co-IP: Co-Immunoprecipitation, 免疫共沉淀

Amp: Ampicillin, 氨苄青霉素

Kan: kanamycin, 卡那霉素

AP: alkaline phosphatase, 碱性磷酸酶

BSA: bovine serum albumin, 牛血清白蛋白

CP: capsid protein, 衣壳蛋白

DTT: dethiothreitol, 二硫苏糖醇

EDTA: thylene minetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸

His: Histidine, 组氨酸

V5: 来自猿猴病毒 5(SV5)副粘病毒的 P 和 V 蛋白的 14 氨基酸肽

TEM: Transmission electron microscopy, 透射电镜

IPTG: isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, 异丙基- β -D-半乳糖苷

ORF: open reading frame, 开放阅读框

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis, 聚丙烯酰胺凝胶电泳

PTA: phosphotungstic acid, 磷钨酸

SDS: sodium dodecyl sulfate, 十二烷基硫酸钠

EDTA: thylene minetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸

eEGFP: enhanced Green Florescent Protein, 增强型绿色荧光蛋白

WSSV: white spot syndrome virus, 对虾白斑综合症杆状病毒

摘要

对虾白斑综合症病毒 (White spot syndrome virus, WSSV) 是一种杆状型双链 DNA (~300kb) 病毒。该病毒具有双层囊膜, 且不能形成包涵体, 隶属于线形病毒科(Nimaviridae)白斑病毒属(Whispovirus)。WSSV 具有广泛的宿主范围, 具有传染力强, 致死率高的特点, 难以防治。这不仅严重危害对虾养殖, 同时也会对海洋生态环境构成巨大的威胁。本文主要围绕病毒结构蛋白的相互作用的位点进行深入的研究, 此外, 还对病毒衣壳的构成形式、理化耐受性质进行了研究。研究工作的内容主要包括了以下两个方面:

(1)WSSV 病毒主要结构蛋白 VP24(wsv002)、VP26(wsv311)和 VP28(wsv421)是构成囊膜和荚膜的重要组成部分, 三者之间均存在着相互作用。为了进一步了解和掌握囊膜以及荚膜蛋白具体的作用位点和结合形式, 首先利用 PCR 和基因重组技术, 在载体 pET-28a-V5 和 pET-His 上构建了 3 种蛋白的系列缺失突变表达质粒。通过共转化的技术, 共同表达分别带有 V5 标签和 His 标签的多肽, 利用 Co-IP 等蛋白质相互作用的技术, 鉴定了 VP28/VP24 及 VP24 /VP26 之间相互作用的具体结合区域。结果发现 VP24 上存在 3 个与 VP28 相互作用的位点, 分别为: N 端 46/61aa、C 端 148/172aa、C 端 189/208aa; VP28 上存在 1 个与 VP24 作用位点为 N 端 31/65aa; 此外 VP24 上存在 3 个与 VP26 相互作用位点, 分别为 N 端 26/46aa、C 端 148/172aa、C 端 189/208aa; VP26 上存在一个与 VP24 作用位点为 C 端 171/204aa。

(2) 虽然构成WSSV病毒核衣壳的结构蛋白已报道, 但是对于核衣壳或衣壳的一些理化性质至今并不清楚。为了进一步研究了解核衣壳性质以及装配组装机制, 并基于之前本实验室的研究成果, 本论文利用去除DNA以后的衣壳代替核衣壳进行研究, 以排除DNA对核衣壳性质和构成所产生的影响。实验通过不同条件(温度、pH、尿素、SDS、尿素或SDS混合 β 巯基乙醇)处理衣壳, 利用 SDS-PAGE以及透射电子显微镜(TEM)分析处理后的结果, 实验发现衣壳在37℃、45℃时形态结构正常, 随着温度逐渐到达60℃、80℃、100℃时具体结构也逐渐消失并聚合在一起, 但整体框架尚存; 衣壳的形态结构在pH 9.0、pH 9.5、pH 10.0

时保持正常，当到达pH 10.5时结构发生松散并解聚，当到达pH 11.0时衣壳发生降解并已无具体形态结构；在低浓度尿素情况下，衣壳最快在2M尿素处理24h后产生形态结构上的变化，镁离子存在的情况下，衣壳的形态可以保持到2.5M尿素处理12h以后才发生变化；衣壳形态最低在1mM SDS就能发生变化和解聚。通过5%β巯基乙醇混合2mM SDS处理衣壳，衣壳的结构发生剧烈变化，但无法使衣壳粒完全解聚。为进一步分析，通过1.6M高盐混合2M尿素的条件并以不同条件（pH10、超声、反复冻融）处理衣壳，尝试获取衣壳粒。通过实验发现解聚的后衣壳粒以不均一的形式结合。

总而言之，本文对于WSSV病毒的结构蛋白的具体相互作用位点以及对病毒衣壳的结构、理化耐受性质及其组成形式的研究和鉴定是了解病毒结构、组成、包装和侵染的重要基础，将为病毒的防治提供有效科学的依据。

关键词：对虾白斑综合症病毒；蛋白相互作用；衣壳

ABSTRACT

White spot syndrome virus (WSSV) is a rod-shaped, large (about 300kb) doubled-stranded DNA virus with a two-double envelops, which can not generate the inclusion body. The WSSV belongs to the *Nimaviridae* family. As a major pathogen in the cultured *penaeid* shrimp, WSSV has both wide range of hosts in crustaceans and high infection and mortality rate, so it is hard to be controlled. Therefore, WSSV is not only a significant threat to the shrimp industry but also to all of the marine ecology and environment. This thesis mainly focuses on searching the specific interaction domains among the virus structural proteins. In addition, the thesis is also concerned about the assembly mechanism and physicochemical tolerance of capsids research. The work mainly includes the two following aspects:

(1) As the main structure proteins, VP24 (wsv002), VP26 (wsv311) and VP28 (wsv421) occupy the major proportion of the envelop and tegment proteins, with interactions between any two proteins of them. For a better understanding and more global vision of the particular interaction domains and the form of combination which belong to envelop and tegment proteins, we firstly cloned the mutational genes of VP24, VP26 and VP28 and combined them to the corresponding vectors pET-28a-V5 or pET-His respectively by using the molecular techniques like PCR and genome recombination. Through bacterial protein-co-expression and co-transfer, the polypeptides with either His or V5 tag were expressed together. We found the specific domains in the interactions between both VP28 & VP24 and VP28 & VP24 by using the Protein-Protein interaction experiments such as Co-IP. The results show that: VP24 has three domains (N-region 46/61aa, C-region 148/172aa, C-region 189/208aa) which interact with VP28, and VP28 has one domain (N-region 31/65aa) interacting with VP24. Besides, VP24 has three domains (N-region 26/46aa, C-region 148/172aa, C-region 189/208aa) which interact with VP26, while VP26 has only one interactive domain (C-region 171/204aa) with VP24.

(2) Although the nucleocapsid of WSSV contains a few structure proteins, the researches of them are very limited. In order to find out the stability and assembly mechanism of nucleocapsid, we used the capsids excluded DNA as the object of study instead of the nucleocapsid to avoid the influence caused by the DNA. After that, we dealt the capsid with various conditions (temperature, pH, urea, SDS, urea or SDS mixes with β -Mercaptoethanol) and analysed the results by SDS-PAGE and TEM. Subsequently, we confirmed that capsid's structure kept stable when the temperatures were 37°C or 45°C, but the capsid's specific structure began to change and disappear gradually, coupling with the temperature rose up to 60°C, 80°C, 100°C step by step. However, the framework of capsid still remained. Although structures of capsids were not influenced at the conditions of pH 9.0, pH 9.5, pH 10.0, the structures started to loose and depolymerize when the pH reached 10.5. Finally, the pH 11.0 caused degradation of capsids without any fundamental structures left. At the low concentration of urea, the capsids would begin to change first in the 2M urea treatment lasting for 24 hours. And the existence of magnesium ion could delay the process to 2.5M urea treatment last for 12 hours. The change and depolymerization of capsids' structures happened when they were treated with 1mM SDS. Even though the mixture conditions (2mM SDS mixes with 5% β -Mercaptoethanol) could cause fierce depolymerization of the capsid, they could not depolymerize the capsomeres. Furthermore, the capsids were treated mixture buffer (1.6 M high salts and 2M urea) with different conditions (pH 10.0, ultrasonication, multigelation) in order to acquire the capsomeres. The results demonstrated that the capsomers might exist in monomer or polymer.

To sum up, it is meaningful to study and identify the specific interaction domains between the structural proteins and the assembly mechanism and physicochemical tolerance of capsids which may help us to better understand the construction, assembly, maturation and invasion mechanisms of WSSV. Moreover, our research results will lay the scientific basis for WSSV prevention.

Key words: White spot syndrome virus (WSSV), Protein interaction, Capsid

前言

1、对虾白斑综合症病毒(WSSV)及其分子生物学研究

1.1 对虾白斑综合症病毒的研究概况

1.1.1 对虾白斑综合症病毒的发现及其命名

对虾为甲壳动物 (*Crustance*) 十足目 (*Decapoda*) 对虾科 (*Penaeidae*) 对虾属 (*Penaeus*) 的统称, 是一种具有十分重要经济价值的浅海海产大型游泳虾类。上世纪 90 年代, 白斑综合症病毒开始并已经逐步成为对虾养殖中危害最大的病害之一, 并在当年对台湾虾养殖业造成了巨大的损失。1993 年春, 日本养殖对虾大量发生白斑综合症而死亡; 同年 5-8 月, 白斑综合症在中国南部至北部沿海的对虾养殖场中大规模暴发, 养殖对虾产量锐减; 于 1994 年底, 包括泰国南部、印度以及马来西亚的养殖对虾都相继死于该病。随后, 白斑综合症传遍亚洲和印度太平洋地区的绝大多数对虾养殖场。该病毒以其发病快, 致死率高, 传播速度快, 目前已成为全球范围内限制养虾业发展的最主要因素之一, 其典型症状是病虾头胸甲部位可见大量的 0.5-3mm 大小不等的白色斑点(图 1)。

自对虾白斑综合症出现以来, 研究人员从各地相继纯化分离出其病原体(一种新型的非包涵体型杆状病毒), 根据所分离出病毒株的地域分布、原始宿主、形态发生以及主要病理症状, 给予了不同的分离株不同的名称^[1-15](表 1)。在随后的研究中 Lo^[16]利用 PCR 技术比较研究了不同对虾白斑病毒分离株的 DNA 序列, 发现 PCR 产物只存在少许差别。根据以上研究结果, 可以看出各地发现的白斑综合症病毒株之间差异很小, 应为同一种新型病毒。Lightner^[17]等建议将这类杆状病毒统一命名为白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV), 该命名逐渐得到普遍的认可。2005 年, 国际病毒分类委员会(ICTV) 第 8 次报告把 WSSV 放在线形病毒科(*Nimaviridae*) 白斑病毒属(*Whispovirus*)^[18]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库